

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwig

STUDIEN ÜBER DIE HITZESTABILITÄT DES ALPHA-TOXINS VON CLOSTRIDIUM (CL.) WELCHII (PERFRINGENS) TYP A

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Anthony Ndovi
Tierarzt aus Chilumba/Malawi

Berlin 1971
Journal-Nr. 744

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwig

STUDIEN ÜBER DIE HITZESTABILITÄT DES ALPHA-TOXINS
VON CLOSTRIDIUM (CL.) WELCHII (PERFRINGENS) TYP A

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Anthony Ndovi
Tierarzt aus Chilumba/Malawi

Berlin 1971
Journal-Nr. 744

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorsitzender:

Prof. Dr. J. Boch

Referent:

Prof. Dr. H. Hartwigk

Korreferent:

Prof. Dr. G. Reuter



Tag der Promotion: 13.7.1971

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	5
Literatur	6
Eigene Untersuchungen	14
A. Material	15
B. Technik und Methodik	15
1. Herstellung und Erhitzung der Kulturfiltrate	15
2. Haemolyse-Test	16
3. Lecithovitellin-Test	16
4. Letal-Test	17
5. Hautnekrose-Test	17
6. Gewinnung der Kulturfiltrat-konzentrate (Dialysat)	18
Ergebnisse	19
1. Einmalige 30 Minuten lange Erhitzung bei Temperaturen von 40°C - 100°C	19
2. 1 - 30 Minuten lange Erhitzung bei 65°C und 100°C	21
3. Zweimalige Erhitzung bei 65°C und 100°C während 5 oder 30 Minuten	24
4. Erhitzung der konzentrierten A ₁ -Kulturfiltrate	25
Besprechung der Ergebnisse	32
Zusammenfassung	36
Literaturverzeichnis	37



Digitized by the Internet Archive
in 2026

E i n l e i t u n g

Früher durchgeführte Untersuchungen (6) hatten gezeigt, daß nach 5 Minuten langer Erhitzung im Wasserbad bei 100°C Kulturfiltrate, die mit 4 verschiedenen A-Stämmen des Clostridium (Cl.) welchii hergestellt worden waren, ihre letale Eigenschaft für die Maus verloren. Bei allen 4 Filtraten konnten, wenn auch vermindert, noch haemolytische und opaleszierende Eigenschaften nach der Erhitzung festgestellt werden.

Diese Ergebnisse gaben Anlaß zu prüfen, wann die letale Aktivität des alpha-Toxins bei Anwendung verschiedener Temperaturen und unterschiedlicher Erhitzungszeiten aufgehoben wird und wie sich dabei die anderen drei Eigenschaften des alpha-Toxins (haemolysierende, opaleszierende und hautnekrotisierende Eigenschaft) verhalten.

An auf gleiche Weise gewonnenen Kulturfiltraten eines Standard-A-Stammes sollte untersucht werden, welchen Einfluß eine einmalige Erhitzung während 30 Minuten bei Temperaturen von 40°C bis 100°C und eine 1 - 30 Minuten lange einmalige Erhitzung bei 65°C und 100°C auf die 4 Eigenschaften des Toxins hat, und wie sich eine einmalige Erhitzung bei 65°C und eine darauf folgende zweite Erhitzung bei 100°C während 5 und 30 Minuten auf die 4 Aktivitäten des alpha-Toxins auswirken.

Gleiche Versuche sollten an einem Toxinkonzentrat (Dialysat) des gleichen Stammes durchgeführt werden.

L i t e r a t u r

Die Toxine der Clostridien gelten nicht als sehr hitzestabil. Das Tetanospasmin wird nach WILLIS (21) schon in 5 Minuten bei einer Erhitzung bei 65°C zerstört.

MEYER (14) erwähnt, daß das Botulinustoxin sich gegenüber einer Erhitzung verschieden verhält und die Angaben der Autoren über den Einfluß einer Erhitzung bei verschiedenen Hitzegraden und Erhitzungszeiten stark voneinander abweichen. Das Botulinustoxin soll nach einigen Autoren bei 80°C während 1/2 Minute bis 6 Minuten zerstört werden, während andere Autoren berichten, daß 70°C ausreichen, um das Toxin rasch unwirksam zu machen. Weitere Angaben besagen, daß eine Erhitzungsdauer von 2 Minuten - 18 Minuten bei 72°C oder 10 Minuten - 85 Minuten bei 65°C nötig ist, um das Toxin zu schädigen.

Vom Toxin des Clostridium (Cl.) welchii des Types A ist bekannt, daß es bei einer kurzen Erhitzung bei 100°C nicht völlig unwirksam wird. Insbesondere erwies sich das alpha-Toxin dieses Types als relativ hitzestabil.

HERTER (8) wies bereits 1906 darauf hin, daß es bei einer Erhitzung von Kulturfiltraten auf 100°C beim Cl. welchii zu keiner völligen Zerstörung des Toxins kommt. Das war zu einer Zeit, als man die verschiedenen Toxine des Cl. welchii noch nicht kannte und auch nicht wußte, daß es 5 verschiedene Typen dieser Keimart gibt, die durch die gebildeten Toxine differenzierbar sind. Zur Technik dieser Differenzierung siehe OAKLEY und WARRACK (16) sowie BATTY (2).

HENRY (7) sprach schon von einer "meßbaren Menge eines Haemotoxins", das noch nachweisbar ist, wenn das Toxin 15 Minuten lang gekocht wurde, und engte damit den Begriff der Hitzestabilität auf die haemolysierende Eigenschaft der Toxine des Cl. welchii ein.

MACFARLANE und KNIGHT (11) stellten fest, daß die Lezithinase, die mit dem alpha-Toxin des Cl. welchii identisch ist, "relativ hitzestabil ist" und ihre Aktivität bei Verwendung von Boratpufferlösung als Verdünnungsmittel in Kulturfiltraten etwa zu 45% behält, wenn die Filtrate 10 Minuten lang bei 100°C erhitzt werden.

Die erste umfangreiche Arbeit über das Verhalten des alpha-Toxins in Kulturfiltraten gegenüber verschiedenen Hitzegraden veröffentlichten die Franzosen GUILLAUMIE, KREGUER und FABRE (4). Die Autoren prüften das Verhalten der haemolysierenden, opaleszierenden, letalen und nekrotisierenden Eigenschaft des alpha-, theta- und eta-Toxins in Kulturfiltraten gegenüber verschiedenen Hitzegraden bei einmaliger und mehrmaliger Erhitzung, wobei die pH-Werte der Filtrate auf 6.85 - 7.05 eingestellt wurden. Eine 5 Minuten lange Erhitzung der Toxine bei 70°C bewirkte eine starke Reduktion aller 4 Aktivitäten. Durch eine nochmalige 5 Minuten lange Erhitzung bei 100°C konnten die Aktivitäten wieder gesteigert werden. In solchen Fällen kam es aber trotzdem zu einer Reduktion der Dosis letalis minima (Dlm) und der minimalen haemolytischen Dosis um das Zehnfache. Auch war die nekrotisierende und opaleszierende Eigenschaft verringert und die nekrotisierende Eigenschaft konnte durch geringe Dosen eines Antiserums neutralisiert werden. Cystein oder Calcium begünstigten die Wiedererlangung der haemolytischen Eigenschaft bei Kulturfiltraten, die 5 Minuten lang im Wasserbad bei 100°C erhitzt worden waren. Nach 5 Minuten langer Erhitzung von 8 Toxinen bei 70°C war die Gelatinase-, Lezithinase-, dermonekrotisierende, letale und haemolytische Eigenschaft in allen 8 Fällen unterdrückt. Wurden die Toxine dann bei 100°C 5 Minuten lang erhitzt, zeigten sie wieder eine dermonekrotisierende letale und haemolytische Eigenschaft. 4 Toxine verflüssigten geringgradig Gelatine, 7 Toxine brachten menschliches Serum zur Opaleszenz. Ebenso zeigten 4 Toxine unter gleichen Bedingungen ohne Beigabe von Calcium einen geringen Lezithinaseeffekt, während 3 Toxine keine Lezithinasewirkung erkennen ließen.

In einer zweiten Arbeit äußern sich GUILLAUMIE, KREGUER und FABRE (5) über die Ergebnisse ihrer weiteren Untersuchungen, die sich mit den Eigenschaften und der Zusammensetzung des Toxins von Cl. welchii beschäftigten. In dieser Arbeit ist ein besonderer Abschnitt dem Einfluß der Hitze auf die Toxine frischer Präparationen des Cl. welchii, Typ A, gewidmet. In verschiedenen Tabellen werden die Ergebnisse der Erhitzungsversuche bei verschiedenen Temperaturen und Erhitzungszeiten dargestellt. In einer Tabelle wird gezeigt, daß eine 30minütige Erhitzung bei 50°C oder eine 10minütige Erhitzung bei 56°C nicht ausreichen, um die haemolytische Aktivität der Toxine gegenüber Schaferythrozyten zu unterdrücken. Dagegen wirken von 8 Toxinen 7 nicht mehr haemolytisch, wenn sie 30 Minuten einer Temperatur von 56°C ausgesetzt wurden. Die haemolytischen Eigenschaften verschwinden weitgehend, wenn die Toxine 10 und 20 Minuten lang bei 60°C erhitzt werden. Ebenso geht jeder haemotoxische Effekt nach 5 Minuten langer Erhitzung bei 70°C verloren. Die haemolytischen Eigenschaften stellten sich bei 38 untersuchten Toxinen nach einer 5 Minuten langen Erhitzung bei 100°C wieder ein.

Wurden die Toxine 30 Minuten lang bei 100°C erhitzt, erwiesen sich wenige Toxine noch haemolysierend. Eine 60 Minuten lange Erhitzung bei 100°C hingegen machte alle 9 geprüften Toxine haemolytisch unwirksam. Die Autoren versuchten noch, den Verlust an haemolytischer Wirkung nach Reaktivierung mittels der haemolytischen Dosis (Dh) zu errechnen, kamen dabei aber je nach Wirksamkeit der Toxine zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Über die Steigerung der haemolytischen Aktivität der Toxine durch Cystein oder Ca-Azetat oder CaCl_2 oder CaCl_2 mit Cystein wird außerdem noch berichtet. Dabei ist bemerkenswert, daß das Calcium auf die mit Hitze (5 Minuten lang bei 100°C) behandelten Toxine aktivierend wirkt, dagegen diese Aktivierung ausbleibt, wenn eine 5 Minuten lange Erhitzung bei 70°C stattgefunden hat. Die Verwendung von gepufferter und

ungepufferter Kochsalzlösung hatte nach 5minütiger Erhitzung bei 100°C keinen aktivierenden Einfluß auf die haemolytische Eigenschaft der untersuchten Toxine, während Phosphatpuffer sich geringgradig reduzierend auf die haemolytische Aktivität auswirkte.

MASON (13) wurde bei Immunisierung von Pferden mit verschiedenen Clostridien-Antigenen angeregt, eingehende Untersuchungen über die Hitzestabilität der Toxine des A-Types des Cl. welchii durchzuführen. Denn bei Immunisierung von Pferden mit Cl. septicum und oedematicus zeigte sich, daß im Serum der Pferde stets auch geringe Titer gegenüber Cl. welchii nachweisbar waren. MASON konnte sich diese Tatsache zunächst nicht erklären, weil eine Kontamination der zur Hochimmunisierung benutzten Antigene mit Cl. welchii sicher auszuschließen war.

Er war der Ansicht, daß entweder an den Glasgeräten oder an der wiederholt für verschiedene Clostridienstämme verwendeten durch Autoklavierung (1 Std. bei 120°C) sterilisierten Filtermasse alpha-Toxin des Cl. welchii haften geblieben war und dieses antigene Wirkungen bei den Pferden erzeugt hatte. Bei den relativ hohen Mengen von Antigen, das den Tieren injiziert wurde, schien ihm auch eine Induktion von Antikörpern durch aktiv gebliebenes alpha-Toxin trotz der Autoklavierung bei 120°C während 1 Std. möglich zu sein.

MASON erhitzte Kulturfiltrate des Types A von Cl. welchii bei 60°C, 70°C, 80°C und 93°C 1/2 Std. und bei 115°C 1/4 Std. und wies nach, daß alle Filtrate noch die Fähigkeit besaßen, rote Schafblutkörperchen zu haemolysieren. Die haemolytische Aktivität war allerdings im Vergleich zu unerhitzten Filtraten gleicher Art vermindert. Die Filtrate hatten pH-Werte von 6.5 - 7.3, so daß die pH-Werte eine Haemolyse nicht hervorgerufen haben konnten.

MASON erhitzte Kulturfiltrate von 2 A-Stämmen 1/2 Stunde lang bei 115°C und 93°C und konnte in diesen Fällen nachweisen, daß noch aktives alpha-Toxin, das haemolytische opaleszierende Eigenschaften hatte und letal auf Mäuse wirkte, vorhanden war. Auch Kulturfiltrate, die mit 4 anderen A-Stämmen hergestellt worden waren und 1/2 Stunde bei 60°C, 80°C und 93°C und 1/4 Stunde bei 115°C erhitzt wurden, zeigten, wenn auch verringert, haemolytische Eigenschaften gegenüber roten Schafblutkörperchen.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam MASON bei mit Ammonsulfat konzentrierten und dialysierten Trockentoxinen. Diese Toxine wurden in Nährbouillon oder mit Boratpuffer in Lösung gebracht, wobei sich zeigte, daß Boratpuffer die haemolytischen Effekte nach der Erhitzung noch steigerte. Das theta-Toxin glaubte der Autor dadurch ausschließen zu können, daß er die haemolytische Wirkung dieses Toxins nach 1stündiger Aufbewahrung der Dialysat-Blutkörperchengemische bei 37°C im Ergebnis beurteilte. Eine Ablesung der Ergebnisse nach 24stündiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur wertete er im Sinne einer durch das alpha-Toxin bedingten Haemolyse. Nach van HEYNINGEN (9) tritt die Haemolyse in den höheren Toxinverdünnungsstufen bei Kühlschranktemperatur verstärkt auf ("hot-cold"-Phänomen).

Ließ sich die Haemolyse durch Beigabe von Ca-Ionen zu dem Verdünnungsmittel steigern, deutete MASON dies ebenfalls als eine Wirkung des alpha-Toxins. Die weiteren Versuche des Autors erstreckten sich auf eine Immunisierung von Kaninchen und Pferden mit Kulturfiltraten, die mit einmal und mehrmals verwendeten Filtermassen gewonnen worden waren. Bei den wiederholten Einspritzungen der Filtrate kamen bei Kaninchen die Gesamtmengen von 62 ml und bei Pferden von 800 ml und 2000 ml zur Verwendung.

Die Immunisierungsversuche zeigten, daß nur solche Tiere Welchii-Antikörpertiter aufwiesen, denen Filtrate injiziert worden waren, die mit wiederholt bei verschiedenen Clostridienarten verwendeten Filtermassen hergestellt worden waren. Da diese Filtermassen durch Autoklavierung (1 Std. bei 120°C) entkeimt worden waren, ließ sich schlußfolgern,

daß das alpha-Toxin des Cl. welchii durch die Sterilisierung nicht völlig inaktiviert worden war und daher noch antigen wirken konnte.

MASON leitet aus den Ergebnissen seiner Untersuchungen ab, daß das alpha-Toxin bis zu einem beträchtlichen Maße hitzestabil ist, nicht vollständig durch Erhitzung bei 120°C 1 Std. lang zerstört wird und die Bildung von Welchii-Antitoxinen induziert, wenn es Kaninchen und Pferden injiziert wird.

SMITH und GARDNER (20) versuchten "das Phaenomen der anomalen Hitzeaktivierung" abzuklären. Sie stellten fest, daß eine Erhitzung von Kulturfiltraten des Cl. welchii während 10 Minuten bei 100°C zu einer Wiederherstellung der Lezithinase-Eigenschaft des alpha-Toxins zu 80% führte, wenn das Toxin vorher einer 10 Minuten dauernden Erhitzung bei 65°C unterworfen worden war. Sie kultivierten in einem geeigneten Nährmedium (pH 5.6 - 6.5) einen A-Stamm 5 - 6 Stunden lang in einer Gesamtmenge des Mediums von 3 l und konzentrierten das alpha-Toxin mit Ammonsulfat und nachfolgender Dialyse oder verwendeten ein Rohtoxin und ein teilweise gereinigtes Toxin, um die lezithinasewirksamen Einheiten im Lezithovitellin-Test (LVT) zu bestimmen. Dabei wurde ein Boratpuffer (pH 7.6) zur Verdünnung der Dialysate verwendet. Die Erhitzungen erfolgten 10 Minuten lang bei 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C und 100°C mit dem Ergebnis, daß die Erhitzung bei 60°C die stärkste Inaktivierung hervorrief und die Reduktion der Lezithinasewirkung umso ausgeprägter war, je mehr lezithinasewirksame Einheiten in den Dialysaten enthalten waren. Auch der pH-Wert hatte einen Einfluß auf den Erhitzungseffekt, und zwar dahingehend, daß ein pH-Wert von 5.0 - 6.0 die stärkste Inaktivierung bei 65°C erzielte, andererseits eine Erhitzung bei 100°C in diesem pH-Bereich eine völlige Reduktion der Lezithinase-Eigenschaft herbeiführte. Bei dem pH-Bereich 7.0 - 9.0 betrug die Reduktion bei 65°C etwa 90% und bei 100°C 40% im Vergleich zu der Wirksamkeit, die vor der Erhitzung bestanden hatte.

SMITH und GARDNER faßten ihre Ergebnisse dahingehend zusammen, daß das alpha-Toxin durch höhere Temperaturen von 80°C - 100°C weniger stark inaktiviert wird als durch Temperaturen von 60°C - 70°C.

Um den Ursachen für die anomale Hitzeinaktivierung nachzugehen, setzten die Autoren Dialysat-Toxin einer Hitze- einwirkung bei 65°C und danach bei 100°C aus, wobei sie Ca- und Mg-Ionen entweder zusetzten oder nicht zusetzten. Sie konnten zeigen, daß ihre Annahme, daß divalente Ionen bei der Hitzeinaktivierung eine Rolle spielen, zutrifft. Bei Anwendung von Hitze-graden von 65°C kommt es durch Ca- und Mg-Ionen zur Bildung eines Komplexes, der eine Inaktivierung des alpha-Toxins bewirkt. Dieser Komplex wird durch Hitze-grade von 100°C gesprengt, so daß das alpha-Toxin zum Teil wieder frei wird und im Haemolyse- und Lezithinase-Test wirksam werden kann. Die Ca-Ionen sind dabei stärker beteiligt als die Mg-Ionen.

SMITH und GARDNER sind der Ansicht, daß sich wahrscheinlich die Ca-Ionen mit Phosphaten verbinden und in diese Verbindung das Enzym alpha-Toxin einbezogen wird. Durch Erhitzung bei 100°C kommt es zur Dissoziation der Ionen, so daß das Enzym seine Aktivität zum Teil wieder erlangt.

PRÉVOT (13) berichtet ebenfalls über die Thermoresistenz der Toxine des Cl. welchii. Er weist darauf hin, daß das Toxin dieser Keimart nach einer 5 Minuten langen Erhitzung bei 100°C noch aktiv ist, wenn vorher eine Erhitzung von wenigen Minuten bei 70°C stattgefunden hat. Diese Eigenschaft erkennt PRÉVOT dem alpha- und theta-Toxin zu, wobei er betont, daß durch die zweite Erhitzung bei 100°C die haemolytische und nekrotisierende Eigenschaft wieder hergestellt werden kann. Das epsilon-Toxin des Types D verliert nach 5 Minuten langer Erhitzung bei 70°C seine toxischen Eigenschaften und läßt sich durch eine zweite Erhitzung auf 100°C nicht reaktivieren. Hingegen übersteht das Protein des epsilon-Faktors des Types D eine Erhitzung bei 70°C und kann

durch Trypsinbehandlung wieder aktiviert werden.

Nach AL-KHATIB (1) bleibt die haemolysierende Eigenschaft des alpha-Toxins des Cl. welchii nach 10minütiger Erhitzung in kochendem Wasser in gleicher oder verminderter Stärke erhalten.

E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

Der Versuchsplan sah vor, nach der im Institut bei der Gewinnung ausreichender Mengen von alpha-Toxin bewährten Technik ein größeres Quantum Kulturfiltrat zu gewinnen, um dieses vor und nach Erhitzung auf die 4 Aktivitäten des alpha-Toxins (Haemolyse-, Lecithinase-, letale und nekrotisierende Eigenschaft) zu prüfen.

Die Erhitzung wurde entweder bei unterschiedlichen Temperaturen von 40°C - 100°C mit gleicher Expositionsdauer (30 Minuten) oder bei gleichen Temperaturen von 65°C und 100°C mit unterschiedlicher Expositionsdauer (1 - 30 Minuten) vorgenommen.

In weiteren Versuchen wurden die Kulturfiltrate einer zweimaligen Erhitzung unterzogen, wobei zunächst eine 5 Minuten lange Erhitzung bei 65°C und dann eine gleichlange Erhitzung bei 100°C erfolgte. In einem gleichartigen Versuch wurde die Erhitzungszeit auf 30 Minuten erhöht.

In einer letzten Versuchsreihe wurde ein Kulturfiltrat durch Ausfällung mit gesättigtem Ammonsulfat konzentriert und nach Dialyse als "Dialysattoxin" unerhitzt und in verschiedener Weise erhitzt einer Prüfung auf die 4 Aktivitäten unterzogen. Bei diesem Versuch sollten die Ergebnisse des Haemolyse-, Lecithovitellin- und Mäusetestes bei Verwendung von Boratpuffer mit 0.05% CaCl_2 als Verdünnungsmittel des Dialysates überprüft werden. Alle Versuche wurden doppelt durchgeführt, um Zufallsergebnisse möglichst auszuschließen.

A. Material

Als Modellstamm diente ein im Institut seit Jahren gehaltener Typ A-Stamm CN 3920. Dieser war dem Institut 1967 von Burroughs Wellcome & Co., London, übersandt worden. Der Stamm wurde im Institut unter der Bezeichnung A₁ regelmäßig auf Leber-Leber-Bouillon überimpft. Bei Verwendung einer 24stündigen Leber-Leber-Bouillonkultur zur Gewinnung des Inokulums und einer 5stündigen Bebrütung des beimpften Logan-Mediums wies das Kulturfiltrat eine ausreichende Fähigkeit auf, haemolytisch, als Lezithinase, letal oder nekrotisierend auf die Meerschweinchenhaut zu wirken. Es kamen bei den vielen im Institut durchgeführten Untersuchungen nur selten Schwankungen im alpha-Toxingehalt vor.

B. Technik und Methodik

1. Herstellung und Erhitzung der Kulturfiltrate

Mit dem A₁-Stamm wurden nach 5stündiger Bebrütungszeit im Anaerobentopf Logan-Kulturfiltrate in der Weise hergestellt, daß die angesetzten 2 Erlenmeyerkolben mit je 40 ml Kulturmedium bei 5000 U/min. 30 Minuten lang zentrifugiert wurden, um dann die Überstände durch Seitzfilter (EK-Filtergröße Nr.3) mit geringem Saugdruck zu filtrieren.

Die Filtration wurde nach Beendigung der 5stündigen Bebrütung unter aeroben Bedingungen vorgenommen. Soweit eine Testung der Kulturfiltrate nicht sofort möglich war, wurden diese bei -20°C aufbewahrt.

Bezüglich der Zusammensetzung und Herstellung des Logan-Mediums sei auf die Originalarbeit von LOGAN, TYTTELL, DANIELSON und GRINER (10) und v. SCHMUDE (19) verwiesen, sowie auf die Arbeit von FRANKE (3).

Die Erhitzung der Kulturfiltrate oder Kulturfiltratverdünnungen wurde entweder im Wasserbad oder im Kochtopf unter Kontrolle der Temperaturen mit einem Thermometer, das sich in einem Röhrchen mit Wasser im Wasserbad befand, durchgeführt. Bei kurzen Erhitzungszeiten wurde die Erhitzungsdauer mit Stoppuhr, bei längeren mit Laborwecker kontrolliert.

2. Haemolyse-Test

Die haemolytische Aktivität der Filtrate wurde mit dem Haemolyse-Test (=HT) nach OAKLEY (15) und OAKLEY und WARRACK (17) geprüft, wobei eine 6%ige Schaferythrozyten-Suspension verwendet wurde. Jeder Röhrchenansatz kam 1 Stunde ins Wasserbad bei 37°C mit zwischenzeitlichem Durchschütteln nach 1/2 Stunde, wurde dann über Nacht im Kühlschrank bei 5°C aufbewahrt und am folgenden Vormittag beurteilt. Soweit nicht besonders vermerkt, wurden die Verdünnungen der Kulturfiltrate mit physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen. Die Verdünnungsstufen, in denen noch eine mittelgradige Haemolyse (++) vorlag, wurden als Endpunkt gewertet.

3. Lecithovitellin-Test

Für den Nachweis der Lecithinase-Aktivität der Kulturfiltrate diente der Lecithovitellin-Test (LVT) nach MACFARLANE, OAKLEY und ANDERSON (12) mit Eigelb-Emulsion. Die Kulturfiltrate wurden doppelschlägig (1:2, 1:4 usw.) mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) verdünnt. Danach folgten die Beigabe einer gleichen Menge Ei-
emulsion, Wasserbadaufenthalt (1 Std. mit Durchschütteln nach 1/2 Std.) und Aufbewahrung über Nacht bei Zimmertemperatur (22°C - 24°C). Die Ablesung der Ergebnisse wurde am folgenden Tag vormittags vorgenommen.

Ähnlich dem HT wurde als Endtiter das Röhrchen gewertet, das noch eine mäßig starke Opaleszenz (++) zeigte.

4. Letal-Test

Die letale Wirkung im Letal-Test (LT) wurde durch i.v.-Injektion der Kulturfiltratverdünnungen bei weißen Mäusen im Gewicht von 18 - 20 g festgestellt. Die Mäuse entstammten der Institutszucht, wurden konventionell gehalten und waren frei von Krankheitserscheinungen. Die Injektionsdosis betrug stets 0,4 ml je Maus.

Für jede Filtratverdünnungsstufe wurden 2 Mäuse verwendet. Die Beobachtungszeit betrug 24 Stunden p.i. Starben beide Mäuse innerhalb dieser Zeit, wurde dies als ein Zeichen einer letalen Wirkung der injizierten Dosis angesehen.

5. Hautnekrose-Test

Die nekrotisierende Eigenschaft der Kulturfiltratverdünnungen wurde im Hautnekrose-Test (HNT) durch intrakutane Injektion von 0.2 ml bei Albino-Meerschweinchen festgestellt. Nach Depilation des Rückens und der Flanken mit einer Enthaarungscreme wurden die Verdünnungen beiderseitig an insgesamt 10 - 15 vorbezeichneten Stellen mit feiner Kanüle intrakutan eingespritzt. Die Ablesung der Ergebnisse wurde 24 und 48 Stunden p.i. nach einem bestimmten Bewertungsschema vorgenommen. Mit einem Kreuz (+) wurde eine Nekrose an der Injektionsstelle, die einen Durchmesser von 0.1 - 1.0 cm hatte, beurteilt. Zwei Kreuze (++) erhielt eine Reaktion, bei der die Nekrose einen Durchmesser von 2 - 3 cm hatte. Bei einem Durchmesser von 3 - 4 cm wurde die Reaktion mit drei Kreuzen (+++) bewertet.

6. Gewinnung der Kulturfiltratkonzentrate(Dialysat)

Die Gewinnung der Kulturfiltratkonzentrate (Dialysate) erfolgte in üblicher Weise durch Ausfällung mit gesättigter Ammonsulfatlösung unter Eiskühlung bei tropfenweiser Zugabe der Ammonsulfatlösung und dauernder Bewegung der Filtratlösung mit einem Magnetrührer.

Die Lösung blieb 16 - 18 Stunden im Kühlschrank bei 5°C stehen, wobei mit Magnetrührer schwach gerührt wurde. Nach Zentrifugieren während 30 Minuten bei 3000 U/min. wurde das Sediment mit einer 0.02mol Trislösung (Hydroxymethyl-Aminomethan) im Verhältnis 1:10 gelöst und 24 Stunden mit Trislösung bei 2maligem Wechsel dialysiert.

E r g e b n i s s e

1. Einmalige 30 Minuten lange Erhitzung bei Temperaturen von 40°C - 100°C

Die Ergebnisse des HT, LVT, LT und HNT sind in den Diagrammen 1 und 2 dargestellt (S. 20).

Eine Parallelität der Ergebnisse des HT und LVT ist unverkennbar. Bei dem HT kommt es ab 60°C zu einer stärkeren Titerreduktion, während diese beim LVT erst ab 70°C deutlich wird. Ab 75°C bzw. 80°C steigen die Titer wieder an, wobei die LVT-Titer höher als die HT-Titer sind und den Titerstand vor der Erhitzung wieder erreichen.

Eine starke LT-Titerreduktion ergibt sich nach 30 Minuten langer Erhitzung bei 60°C. Ab 75°C ist keine Letalität mehr festzustellen. Die nekrotisierende Aktivität hört bei 65°C auf, stellt sich aber bei 70°C wieder ein und erreicht bei 90°C - 100°C den Titer 1:16 bzw. 1:32.

HT und LVT bei Kulturfiltrat, das 30 min lang bei 40° - 100° C erhitzt wurde

Diagramm 1



LT und HNT bei Kulturfiltrat, das 30 min lang bei 40° - 100° C erhitzt wurde

Diagramm 2



Konditionstufen

2. 1 - 30 Minuten lange Erhitzung bei 65°C und 100°C

a) 65°C

In den Diagrammen 3 und 4 sind die Ergebnisse des HT, LVT, LT und HNT dargestellt (S. 22).

Ein stark reduzierender Einfluß wird beim HT nach 10 Minuten und 20 Minuten und ein gering reduzierender Einfluß beim LVT nach 15 Minuten und 20 Minuten langer Erhitzung bei 65°C deutlich. Eine gewisse Parallelität der Ergebnisse beider Teste ist vorhanden, wobei der LVT bei längerer Erhitzungsdauer höhere Titer anzeigt als der HT.

Die Letalität sinkt nach 20 Minuten und 30 Minuten langer Erhitzung bei 65°C auf 1:4, die nekrotisierende Eigenschaft auf 1:4 bzw. 0 ab.

b) 100°C

Die Ergebnisse des HT, LVT, LT und HNT siehe Diagramme 5 und 6 (S. 23)

Beim HT kommt es mit zunehmender Dauer der Erhitzung zu einem kontinuierlichen Titerverlust. Doch beträgt der Titer nach 30 Minuten langer Erhitzung noch 1:8. Beim LVT fehlt das Absinken der Titer bei längerer Erhitzungsdauer. Der Titer schwankt zwischen 1:32 und 1:128. Nach 30 Minuten langer Erhitzung liegt er noch bei 1:64.

Nach 10 Minuten und 15 Minuten langer Erhitzung sinkt der LT-Titer auf 1:2, nach 20 Minuten und 30 Minuten langer Erhitzung auf 0. Der HNT-Titer hingegen wird nach 10 Minuten bis 20 Minuten langer Erhitzung auf 1:16 reduziert und steigt nach 30 Minuten langer Erhitzung wieder um 1 Stufe an.

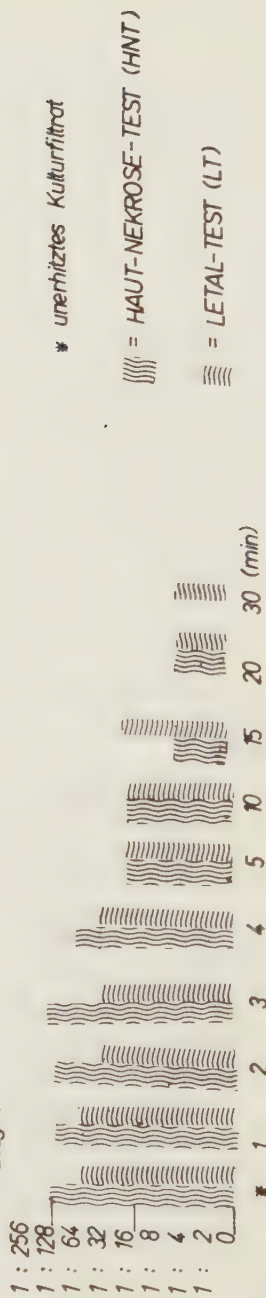
HT und LVT bei Kulturfiltrat, das 1-30 min lang bei 65°C erhitzt wurde

Diagramm 3



LT und HNT bei Kulturfiltrat, das 1-30 min lang bei 65°C erhitzt wurde

Diagramm 4



HT und LVT bei Kulturfiltrat, das 1-30 min lang bei 100°C erhitzt wurde

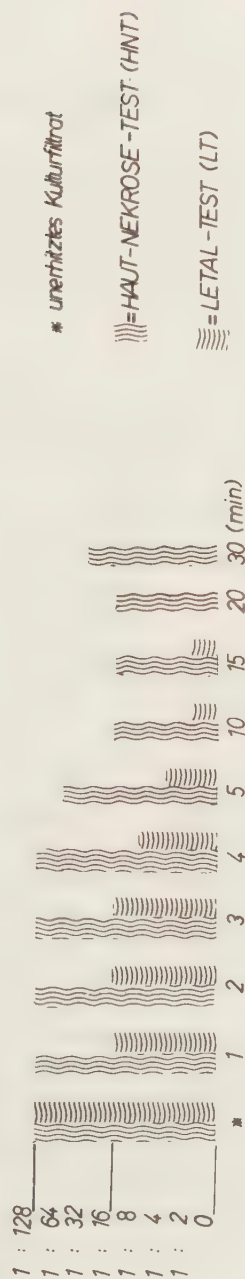
Diagramm 5



Verdünnungsstufe

LT und HNT bei Kulturfiltrat, das 1-30 min lang bei 100°C erhitzt wurde

Diagramm 6



3. Zweimalige Erhitzung bei 65°C und 100°C während 5 oder 30 Minuten

Das Kulturfiltrat wurde 5 Minuten lang auf 65°C erhitzt, mit den 4 Testen nach der Erhitzung geprüft und dann 5 Minuten lang bei 100°C erhitzt und abermals mit den Testen geprüft. Das gleiche geschah bei einer 30 Minuten langen Erhitzung bei 65°C und 100°C.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tab. 1: Reziproke Endtiter bei den 4 Testen nach zweimaliger Erhitzung

Dauer	Häufigkeit d. Erhitzung	Temperatur	Reziproke Endtiter			
			HT	LVT	LT	HNT
5 Min.	1. Erhitzung	65°C	128	64	16	8
	2. Erhitzung	100°C	16	32	8	16
30 Min.	1. Erhitzung	65°C	4	16	4	0
	2. Erhitzung	100°C	8	32	0	4
		Unerhitzt	128	128	32	32

Die erwartete Steigerung der vier Aktivitäten des Kulturfiltrates nach der 2. Erhitzung bei 100°C läßt sich bei 5 Minuten langer Erhitzung nicht in allen Fällen nachweisen. Beim HT, LVT und LT kommt es nach der zweiten Erhitzung auf 100°C zu einer Titerreduktion, beim HNT zu einem Titeranstieg um 1 Verdünnungsstufe.

Bei der 30 Minuten langen Erhitzungsdauer sanken die Titer bei allen 4 Testen erheblich ab, wobei der HNT den 0-Punkt erreicht.

Die zweite ebenfalls 30 Minuten dauernde Erhitzung bei 100°C bewirkt beim HT, LVT und HNT einen Titeranstieg, beim LT aber einen völligen Titterschwund.

4. Erhitzung der konzentrierten A₁-Kulturfiltrate (Dialysate)

Die Erhitzung der mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellten Dialysat-Verdünnungen während 30 Minuten bei Temperaturen von 40°C - 100°C führte beim HT, LVT, LT und HNT zu folgenden Ergebnissen (Diagramme 7 und 8, S. 26):

Die haemolytische Eigenschaft sinkt mit steigender Temperatur ab und erzielt nach Erhitzung bei 80°C bis 90°C den niedrigsten Stand (Titer 1:8), um dann bei 95°C und 100°C wieder um 1 Stufe anzusteigen.

Der Tiefpunkt (1:4) liegt bei der LV-Aktivität bei 65°C - 75°C. Ihm folgt bei 80°C - 100°C ein kontinuierlicher Anstieg bis auf 1:32.

Die letale Eigenschaft nach 30 Minuten langer Erhitzung auf 65°C geht verloren und zeigt sich bei höheren Temperaturen nicht wieder.

Die hautnekrotisierende Eigenschaft sinkt bei 70°C - 80°C auf 1:2 und steigt bei 85°C - 100°C wieder auf 1:16 an.

Die Ergebnisse der Erhitzungsversuche bei 65°C während 1 - 30 Minuten sind in den Diagrammen 9 und 10 (S. 27) dargestellt.

Mit zunehmender Erhitzungsdauer bleiben die Titerreduktionen beim HT und LVT bei 65°C relativ gering, wobei sie sich in beiden Testen ziemlich gleich verhalten, der HT aber gering höhere Titer als der LVT aufweist.

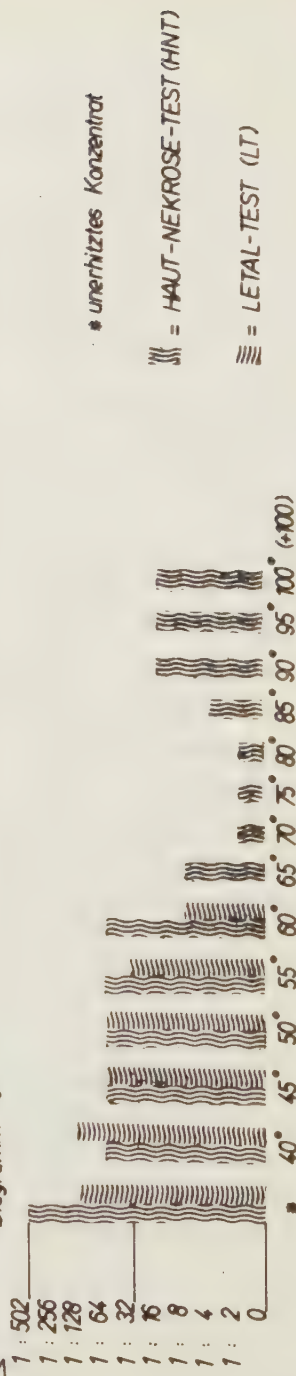
HT und LVT bei Konzentrat, das 30 min lang bei 40°-100°C erhitzt wurde

Diagramm 7



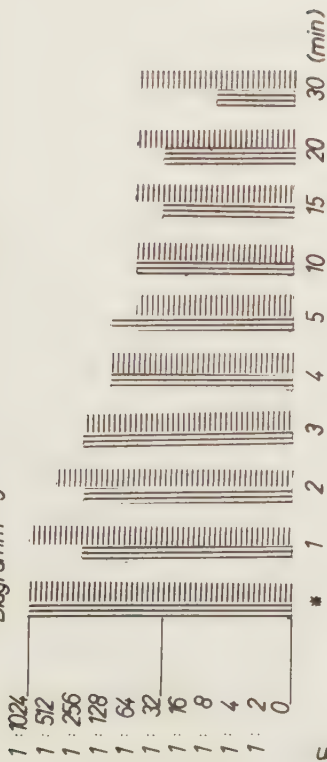
LT und HNT bei Konzentrat, das 30 min lang bei 40°-100°C erhitzt wurde

Diagramm 8



HT und LVT bei Konzentrat, das 1-30 min lang auf 65°C erhitzt wurde

Diagramm 9



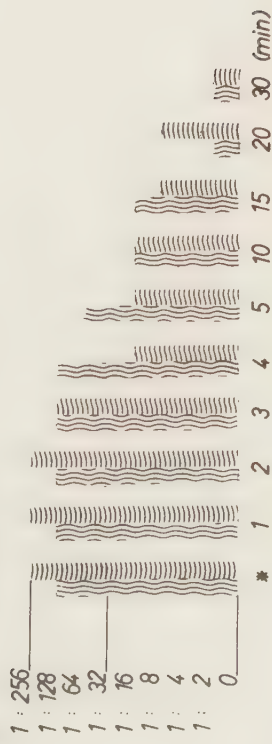
* unerhitztes Konzentrat

|||| = LECITHOVITELLIN-TEST (LVT)

≡ = HÄMOLYSE-TEST (HT)

LT und HNT bei Konzentrat, das 1-30 min lang auf 65°C erhitzt wurde

Diagramm 10



* unerhitztes Konzentrat

|||| = HAUT-NEKROSE-TEST (HNT)

≡ = LETAL-TEST (LT)

Beim LT und HNT verringern sich die Titer mit zunehmender Erhitzungsdauer. Nach 30 Minuten langer Erhitzung werden in beiden Testen die Titer 1:2 festgestellt.

Die Ergebnisse der gleichen Erhitzungsversuche bei 100°C sind in den Diagrammen 11 und 12 (S. 29) dargestellt.

Ein kontinuierlicher Titerabfall tritt bei zunehmender Erhitzungsdauer bei 100°C sowohl beim HT als auch beim LVT ein, wobei die Titer beim LVT tiefer als beim HT liegen. Nach 30 Minuten langer Erhitzung wird beim HT ein Titer von 1:16 und beim LVT von 1:2 festgestellt.

HT und LVT bei Konzentrat, das 1-30min lang auf 100°C erhitzt wurde

Diagramm 11



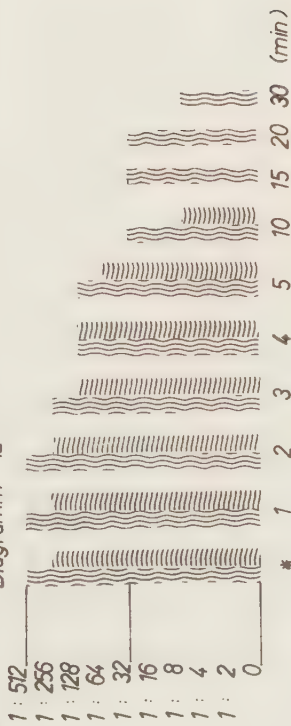
* unerhitztes Konzentrat

||| = LECITHOVITELLIN-TEST (LVT)

||| = HÄMOLYSE-TEST (HT)

LT und HNT bei Konzentrat, das 1-30min lang auf 100°C er

Diagramm 12



* unerhitztes Konzentrat

||| = HAUT-NEKROSE-TEST (HNT)

||| = LETAL-TEST (LT)

Beim LT und HNT kommt es mit zunehmender Erhitzungsdauer ebenfalls zu einer Titerreduktion. Die letale Eigenschaft geht nach 15 - 30 Minuten langer Erhitzung bei 100°C verloren. Hingegen bleibt die nekrotisierende Eigenschaft erhalten. Bei 10 - 20 Minuten langer Erhitzung wirkte noch die Verdünnung 1:32, bei 30 Minuten langer Erhitzung wirkte die Verdünnung 1:8 nekrotisierend.

Die Ergebnisse einer zweimaligen Erhitzung der Dialysatverdünnungen bei 65°C und 100°C 5 Minuten und 30 Minuten lang sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

Tab. 2: Reziproke Endtiter bei den 4 Testen nach zweimaliger Erhitzung bei 65°C und 100°C

Dauer	Häufigkeit d. Erhitzung	Temperatur	Reziproke HT	Endtiter LVT	LT	HNT
5 Min.	1. Erhitzung	65°C	128	32	8	16
	2. Erhitzung	100°C	32	64	2	16
30 Min.	1. Erhitzung	65°C	8	4	2	4
	2. Erhitzung	100°C	16	16	0	8
		Unerhitzt	1024	256	128	256

Am stärksten wird die letale Eigenschaft durch die Erhitzung geschädigt. Sie sinkt bei der erstmaligen 5 Minuten dauernden Erhitzung bei 65°C von der Verdünnung 1:128 auf die Verdünnung 1:8 und bei der zweiten 5 Minuten langen Erhitzung bei 100°C auf die Verdünnung 1:2 ab. Eine erstmalige Erhitzung während 30 Minuten auf 65°C führt zu einem Titterschwund auf 1:2. Nach nochmaliger 30 Minuten langer Erhitzung bei 100°C wird die Letalität aufgehoben.

Bei der ersten 5 Minuten langen Erhitzung auf 65°C werden die Titer von HT, LVT und HNT gesenkt. Eine weitere Reduktion ergibt sich bei nochmaliger 5 Minuten langer Erhitzung bei 100°C.

Beim HT, LVT und HNT kommt es durch die erste 30 Minuten lange Erhitzung bei 65°C zu einer starken Titerreduktion. Die zweite gleichlange Erhitzung bei 100°C wirkt bei diesen Testen gering titersteigernd.

Ein weiterer Versuch wurde mit gleichem Dialysat und Verwendung von Boratpuffer mit 0.05% CaCl_2 als Verdünnungsmittel durchgeführt. Die Verdünnungen wurden im Wasserbad bei 40°C bis 100°C während 30 Minuten erhitzt und dann auf ihre haemolysierenden und opaleszierenden Eigenschaften geprüft.

Das unerhitzte Dialysat zeigte im HT einen Endtiter von 1:1024. Der Titer sank um 1 Stufe nach 30 Minuten langer Erhitzung bei 45°C und 50°C ab. Bei 55°C betrug der Endtiter 1:128, bei 60°C und 65°C 1:32, bei 70°C 1:16, bei 75°C 1:8 und bei 80°C, 85°C und 90°C 1:2. Bei 95°C und 100°C zeigte sich ein Anstieg der haemolytischen Wirksamkeit um eine Titerstufe (1:8).

Der LVT ergab ähnlich wie der HT einen Titerabfall bei steigender Temperatur. Bei 60°C sank der Titer von 1:1024 auf 1:64, bei 65°C auf 1:16, bei 70°C auf 1:8 und bei 75°C auf 1:2. Ab 80°C stieg der Titer auf 1:4, 1:8 (90°C) und 1:64 (95°C und 100°C) wieder an.

In einem anderen Versuch wurden die mit Boratpuffer +0,05% CaCl_2 hergestellten Verdünnungen einer zweimaligen Erhitzung während 5 Minuten und 30 Minuten bei 65°C unterworfen und auf ihre letale Eigenschaft geprüft. Der LT-Titer betrug bei 5 Minuten langer Erhitzung bei 65°C 1:16 und sank um eine Titerstufe nach einer zweiten 5 Minuten langen Erhitzung bei 100°C auf 1:8. Eine 30 Minuten lange Erhitzung bei 65°C senkte den Titer auf 1:4, eine nochmalige gleichlange Erhitzung bei 100°C auf 0.

B e s p r e c h u n g d e r E r g e b n i s s e

Die an Kulturfiltraten eines A-Stammes des Cl. welchii durchgeführten Erhitzungsversuche zeigten je nach Temperatur und Erhitzungszeit unterschiedliche Wirkungen auf die Toxine. Nach PRÉVOT muß man in Filtraten des A-Types mit dem Vorliegen von alpha- und theta-Toxin rechnen. Meine Erhitzungsversuche dürften sich aber in der Hauptsache auf das alpha-Toxin ausgewirkt haben, denn die Art der Gewinnung der Kulturfiltrate schloß das Vorliegen von theta-Toxin weitgehend aus und die Eigenschaft des Toxins, opaleszierend auf Eiemulsion zu wirken, besitzt nur das alpha-Toxin.

Wie GUILLAUMIE, KREGUER und FABRE, ferner MASON und SMITH und GARDNER schon festgestellt haben, trat auch bei meinen Versuchen eine Reduktion der vier Aktivitäten des alpha-Toxins ein, wenn eine Erhitzung bei 65°C und 70°C stattgefunden hatte. Die Reduktion verstärkte sich bei diesen Temperaturen mit zunehmender Erhitzungsdauer. Eine Erhitzung auf 100°C während 5 Minuten führte in der Regel zu einer Reaktivierung der haemolytischen opaleszierenden und hautnekrotisierenden Eigenschaft, aber diese Reaktivierung blieb bei der mäuseletalen Wirkung aus. Bei Verlängerung der Erhitzungsdauer auf 20 und 30 Minuten bei 65°C sank die letale Eigenschaft weiter ab. Die Erhitzung bei 100°C während 20 und 30 Minuten machte das letale Toxin für Mäuse wirkungslos.

Die hautnekrotisierende Eigenschaft des alpha-Toxins führte zum Teil zu widerspruchsvollen Ergebnissen. Dies erklärt sich wohl dadurch, daß die strenge intrakutane Injektion beim Meerschweinchen nicht immer gelingt und die Kontrolle fehlt, ob das Inokulum in der injizierten Menge von 0.2 ml in der Haut verbleibt und wirken kann.

Bei einer 5 Minuten langen Erhitzung bei 65°C und einer darauf folgenden gleichlangen Erhitzung bei 100°C kam es nicht zu einem Steigerungseffekt bei der haemolysierenden, opaleszierenden und letalen Eigenschaft. Lediglich die hautnekrotisierende Wirkung wurde geringgradig erhöht. Wurde die Erhitzungszeit auf 30 Minuten verlängert, steigerte sich nach der zweiten Erhitzung die haemolytische, opaleszierende und hautnekrotisierende Aktivität geringgradig. Hingegen ließ sich die letale Eigenschaft nach der zweiten Erhitzung nicht reaktivieren.

Die Erhitzungsversuche an einem Dialysat-Toxin führten zu ähnlichen Ergebnissen wie bei den Kulturfiltraten. Nur traten die Unterschiede in der Toxinwirksamkeit bei den Dialysaten durch den höheren Toxingehalt vor und nach der Erhitzung deutlicher in Erscheinung. Die haemolytische Eigenschaft verminderte sich bei 30 Minuten langer Exposition mit steigender Temperatur, sie erhöhte sich bei 95°C und 100°C geringgradig.

Die niedrigste Wirkungsstufe erreichte die opaleszierende Eigenschaft nach 30 Minuten langer Exposition bei 65°C und 75°C. Bei 80°C - 100°C stieg sie wieder an.

Die letale Eigenschaft ging nach 30 Minuten langer Erhitzung bei 65°C verloren und ließ sich durch höhere Temperaturen nicht reaktivieren.

Die hautnekrotisierende Eigenschaft sank bei 70°C und 80°C stark ab und verstärkte sich bei 85°C - 100°C.

Von dem Ergebnis eines zweimaligen Erhitzungsversuches ist bemerkenswert, daß eine Reaktivierung der letalen Wirkung durch eine zweite Erhitzung bei 100°C (5 oder 30 Minuten) nicht möglich war. Hingegen ergab die zweite

30 Minuten lange Erhitzung einen steigernden Effekt auf die haemolysierende, opaleszierende und hautnekrotisierende Eigenschaft.

Versuche, durch Verwendung von Boratpuffer +0,05% CaCl_2 als Verdünnungsmittel bei dem Dialysat-Toxin die Ergebnisse zu verbessern, führten zu einer geringen Steigerung der haemolysierenden und opaleszierenden Aktivitäten.

Eine 30 Minuten lange Erhitzung schädigte die haemolytische Eigenschaft bei 75°C - 90°C am stärksten. Bei 95°C und 100°C kam es zu einer geringen Reaktivierung.

Die opaleszierende Eigenschaft sank bei 60°C ab, erholte sich bei 80°C wieder und erreichte bei 95°C und 100°C relativ hohe Titer von 1:64.

Die letale Wirkung verminderte sich bei zweimaliger 5 Minuten langer Erhitzung bei 65°C und 100°C . Sie erreichte nach 30 Minuten langer Erhitzung bei 65°C den Nullpunkt und ließ sich nach nochmaliger 30 Minuten langer Erhitzung bei 100°C nicht wieder reaktivieren.

Ein Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Autoren zeigt, daß eine Übereinstimmung darin besteht, daß kurzzeitige Erhitzungen von Typ-A-Kulturfiltraten bei 65°C und 75°C die haemolysierende, opaleszierende und hautnekrotisierende Eigenschaft des alpha-Toxins relativ stark schädigen und Temperaturen von 90°C und darüber eine Reaktivierung dieser Eigenschaften herbeiführen, wobei allerdings geringere Wirkungsgrade als vor der Erhitzung erzielt werden.

Keine Übereinstimmung meiner Ergebnisse mit den Ergebnissen früherer Autoren besteht hinsichtlich der letalen Eigenschaft des alpha-Toxins. Die Letalität nahm ab mit Steigerung der Temperatur und längerer Erhitzungsdauer und ließ sich auch bei kurzzeitiger Erhitzung bei 100°C nicht wieder herstellen.

Ob dieses Verhalten der Letalität für alle A-Stämme gilt, erscheint zweifelhaft. Denn GUILLAUMIE und Mitarbeiter berichteten, daß die von ihnen mit verschiedenen A-Stämmen hergestellten und geprüften Kulturfiltrate sich bei Erhitzungsversuchen in der Thermostabilität der Toxineigenschaften unterschiedlich verhielten. Durch Erhitzungsversuche an Kulturfiltraten einer größeren Zahl von A-Stämmen wäre nur zu klären, welche Grundsätze für die Hitzestabilität der vier verschiedenen Eigenschaften des alpha-Toxins allgemeine Gültigkeit haben.

Z u s a m m e n f a s s u n g

1. Eine 10 - 30 Minuten lange Erhitzung bei 65°C, 70°C und 75°C führte bei Kulturfiltraten und Kulturfiltratkonzentraten eines A-Stammes von Cl. welchii zu einer starken Reduktion der haemolysierenden, opaleszierenden, letalen und hautnekrotisierenden Eigenschaft. Erhitzungen von 5 Minuten bei 65°C bewirkten eine geringe Reduktion.
2. Eine zweite Erhitzung bei 100°C reaktivierte in der Regel die haemolysierende, opaleszierende und hautnekrotisierende Eigenschaft, wenn diese durch vorherige kurzzeitige Erhitzung bei 65°C und 70°C verringert worden war. Der Reaktivierungseffekt konnte durch Verwendung von Boratpuffer mit 0.05% CaCl₂ als Verdünnungsmittel verstärkt werden.
3. Die letale Eigenschaft des alpha-Toxins, die nach erstmaliger 5 Minuten oder 30 Minuten langer Erhitzung bei 65°C verringert worden war, ließ sich durch eine gleichlange zweite Erhitzung bei 100°C nicht reaktivieren. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Ergebnissen, die andere Autoren in früheren Jahren erzielt haben, und läßt sich nur durch ein unterschiedliches Verhalten des alpha-Toxins bei verschiedenen A-Stämmen erklären. In diese Richtung weisen Versuchsergebnisse französischer Autoren, die bei Kulturfiltraten zahlreicher A-Stämme auch nicht in jedem Fall die gleiche Hitzestabilität bei dem alpha-Toxin dieser Stämme feststellen konnten.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Al-Khatib, G. Untersuchungen über hämolysierende und hämagglutinierende Eigenschaften der pathogenen Anaerobier, geprüft an Erythrozyten des Menschen und der meisten Haustierarten
Mh.Vet.Med.19, 803 (1964)
2. Batty, I. Routine typing of Clostridium welchii (perfringens)
Burroughs Wellcome & Co., Informationsblatt London (1970)
3. Franke, F. Intrakutantest mit Toxinfiltraten von Cl. welchii an immunisierten Meerschweinchen unter besonderer Berücksichtigung der Typendifferenzierung
Vet.med.Diss., Berlin F.U.(1968)
4. Guillaumie, M.,
A.Kreguer und
M. Fabre Thermolabilité et thermoregénération des antigenes de la toxine perfringens.
Ann.Inst.Pasteur 72, 12 (1944)
5. Guillaumie, M.,
R. Kreguer und
M. Fabre Propriétés et composition de la toxine de Welchia perfringens
I. Action hemolytique
Ann.Inst.Pasteur 72, 12 (1946)
6. Hartwig, H. und
H. Chenitir Nachweis des alpha-Toxins von Cl. welchii durch Testblättchen
Zbl.Vet.Med., R.B., 16, 266 (1969)
7. Henry, H. On the composition of B. welchii toxin
J.Path.Bact.25, 1 (1922)
zit. nach Mason (13)
8. Herter, C.A. On bacterial processes in the intestinal tract in some cases of advanced anaemia with special reference to infection with B.aerogenes capsulatus (B.welchii)
J.Biol.Chem.2, 1 (1906)

9. Heyningen van, W.E. Biochemistry of the gas gangrene toxins
Biochem. J. 35, 1246 (1941)

10. Logan, M.A., Production of Clostridium
A.G.Tyttell, perfringens alpha-toxin
I.S.Danielson und J.Immunol.51, 317 (1945)
A.M.Griner

11. Macfarlane, M.G. und The biochemistry of bacterial
B.C.J.G.Knight toxins
1. The lecithinase activity of
Cl. welchii toxins
Biochem. J. 35, 884 (1941)

12. Macfarlane, R.G., Haemolysins and the production
C.L.Oakley und of opalescence in serum and
C.G.Anderson lecithovitellin by alpha-toxin
of Cl. welchii
J.Path.Bact.52, 99 (1941)

13. Mason, J.H. The thermostability of the toxic
components of Clostridium welchii
type A
S.Afr. J.med. Sci.12, 61 (1947)

14. Meyer, K.F. Botulinus
in: Kolle, W., R.Kraus u.
P.Uhlenhuth: Handbuch d.patho-
genen Mikroorganismen.
3.Aufl.G.Fischer, Jena; Urban
& Schwarzenberg, Berlin, Wien.
B.C.J., Bd.4, T.2, S.1269

15. Oakley, C.L. The toxins of Clostridium welchii
A critical review.
Bull.Hyg.18, 781 (1943)

16. Oakley, C.L. und Routine typing of Clostridium
G.H.Warrack welchii
J.Hyg.51, 102 (1953)

17. Oakley, C.L. und Factors affecting the activity
G.H.Warrack of the alpha-Toxin of Cl.welchii
J.Path.Bact.53, 335 (1941)

18. Prévot, A.R. Biologie des maladies dues aux
anaérobies
Flammarion Paris. S.232, 252 u.
256 (1955)

19. Schmude von, D.E. Vergleich der alpha-Toxinbildung
von A-Stämmen des Clostridium
(Cl.) welchii (perfringens) in
zwei von Logan und Mitarbeitern
empfohlenen Nährmedien
Vet.med.Diss. Berlin F.U. (1971)
20. Smith, L.Ds. und The anomalous heat inactivation
M.V.Gardner of Clostridium perfringens
lecithinase
Arch.Biochem.25, 54 (1950)
21. Willis, A.T. Clostridia of wound infection.
Butterworth, London (1969)

Herrn Prof. Dr. Hans Hartwig danke ich für die Überlassung des Themas, für seine Gastfreundschaft und für die mir jederzeit gewährte menschliche und fachliche Unterstützung besonders herzlich.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Institutes für Veterinär-Hygiene für die immer bereitwillig geleistete Unterstützung und für die angenehme Zusammenarbeit.

L e b e n s l a u f

Am 6.5.1937 wurde ich, Anthony Ndovi, als Sohn des Beamten Alexander Bolli Ndovi und seiner Ehefrau Bernes geb. Nyakhondowe in Chilumba/Malawi geboren.

Von 1943 - 1949 besuchte ich die Limbe Catholic Junior Primary School, anschließend von 1949 - 1954 die Saint Patrick's Senior Primary School Mzedi/Limbe. Nach vierjährigem Besuch der Catholic Secondary School, Zomba, erhielt ich 1959 das University of Cambridge-Overseas-School-Certificate.

Von 1960 - 1962 war ich im Ministry of Health in Dar-es-Salaam/Tanzania tätig. 1963 kam ich nach Erlangen und absolvierte zunächst einen deutschen Sprachkursus an der Universität. Von 1964 - 1965 besuchte ich das Niedersächsische Studienkolleg in Hannover, das ich mit einer Abschlußprüfung erfolgreich beendete.

Das Studium der Veterinärmedizin begann ich im Sommersemester 1965 an der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Hier bestand ich im Jahre 1967 das Physikum. 1968 immatrikulierte ich mich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin, an der ich das Staatsexamen im November 1970 ablegte.

Meine Praktikantenzeit absolvierte ich bei Herrn Dr. med. vet. Bismarck in Twedt Kreis Schleswig und zum Teil an der Klinik für Klauentierkrankheiten und Geburtshilfe der Freien Universität Berlin.

Die Approbation als Tierarzt erhielt ich am 30.12.1970.

